

RITELE HERNANDEZ DA SILVA

**ESTUDO DE MARCADORES GLIAIS E DA ENZIMA
INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE EM RATOS SUBMETIDOS
À PRIVAÇÃO MATERNA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
do Extremo Sul Catarinense -
UNESC, para a obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Drº. João Luciano
de Quevedo
Coorientador: Profª. Drª. Gislaine Zili
Réus

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Ritele Hernandez da.

Estudo de marcadores gliais e da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase em ratos submetidos à privação materna / Ritele Hernandez da Silva – 2017.

81 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: João Luciano de Quevedo.

Coorientação: Gislaíne Zilli Réus.

1. Transtorno depressivo maior. 2. Privação materna. 3. Imunorreatividade da proteína glial fibrilar ácida. 4. Ativação microglial. 5. Indoleamina 2,3-dioxigenase. I. Título.

CDD 23. ed. 616.89

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

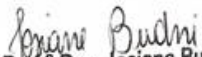
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

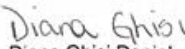
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 308

Com início às 15h00 (quinze horas) do dia trinta do mês de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Ritele Hernandez Silva**, sob a orientação do Prof. Dr. João Luciano de Quevedo, intitulada **"ESTUDO DE MARCADORES GLIAIS E DA ENZIMA 2,3 DIOXIGENASE EM RATOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dra. Karen Jansen (Universidade Católica de Pelotas - UCPel) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h00 (dezesseis horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito).


Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta PPGCS
Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências e do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, ambos pertencentes ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

*Dedico esse trabalho aos meus
amores: Leandro, Gabriela e
Henrique.*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio incondicional! Meu marido Leandro, companheiro de todas às horas, e meus filhos, motivação maior. A meus pais, Sônia e Pedro (*in memoriam*) exemplos de perseverança e reconstrução. Ao meu irmão pelo exemplo de caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Luciano de Quevedo pela oportunidade e confiança. A minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Gislaïne Zilli Réus pela presença constante, incentivo e paciência ao longo desses dois anos.

Aos colegas mestrandos, doutorandos e alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiopatologia Experimental, em especial do Grupo de estudo em Depressão, pela dedicação constante e, que sem os quais, esse trabalho não poderia ser realizado.

“As deficiências de nossa descrição provavelmente desapareceriam se já pudéssemos substituir os termos psicológicos por termos fisiológicos e químicos.”

Sigmund Freud

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	Cortex Pré-Frontal
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico (sigla do inglês)
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida (sigla do inglês)
Iba-1	Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1 (sigla do inglês)
IDO	Enzima Indoleamina 2,3 Dioxigenase
IGF-1	Fator De Crescimento Semelhante À Insulina Tipo 1 (sigla do inglês)
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL- 6	Interleucina-6
IL- 8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-25	Interleucina-25
ISRS	Inibidores da Receptação de Serotonina
ISRSN	Inibidores Seletivos da Receptação de Serotonina e Noradrenalina
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro
NGF	Fator De Crescimento Neural
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NT-3	Neurotrofina-3
NO	Óxido Nítrico (sigla do inglês)
PM	Privação Materna
PND	Dia Pós Nascimento (sigla do inglês)
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF	Teste do Nado Forçado
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

RESUMO

Estudos demonstraram que a exposição a um ambiente adverso no início da vida pode estar relacionado à vulnerabilidade para o desenvolvimento posterior do transtorno depressivo maior (TDM). A privação materna (PM) induz mudanças comportamentais e afeta os circuitos cerebrais que podem estar associados à fisiopatologia do TDM. Assim, este estudo teve como objetivo investigar os papéis que a microglia, os astrócitos e a indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) desempenham em diferentes períodos do desenvolvimento seguido da PM no início da vida. Os tempos de imobilidade no teste de nado forçado (TNF) foram avaliados nos dias pós-natais (PND) 20, 30, 40 e 60. A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada no PND 10, 20, 30, 40 e 60 para investigar alterações induzidas pelo PM no hipocampo através da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de astrócito, e da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1), um marcador de microglia. Além disso, nos mesmos PND, utilizou-se RT-PCR em tempo real para investigar alterações induzidas pela PM na expressão de GFAP, IDO e AIF-1, um marcador de microglia, no córtex frontal (CF) e no hipocampo. Os resultados demonstraram que não houve alteração nos tempos de imobilidade nos PND 20, 30 ou 40. No entanto, no PND 60, os ratos submetidos à PM exibiram um comportamento depressivo como demonstrado pelo aumento no tempo de imobilidade. Os níveis de células imunopositivas de GFAP não mudaram nos PND 10 ou 30. No PND 20, os níveis de células imunopositivas de GFAP diminuíram em ratos submetidos à PM. Foi observado um aumento na expressão de células imunopositivas de GFAP nos PND 40 e 60 em ratos privados de mãe. Verificou-se que os níveis de Iba-1 aumentaram em PND 10, 20 e 30. Não houve alteração nos níveis de células imunopositivas para Iba-1 nos PND 40 ou 60. A expressão de IDO foi reduzida no hipocampo no PND 10, e elevada no CF no PND 60 após a PM. A expressão de GFAP por RT-PCR diminuiu no CF no PND 10, e verificou-se que aumentou no hipocampo no PND 60 nos ratos privados de mãe. A expressão de AIF-1 aumentou no CF nos PND 20 e 60 após a PM. Em conclusão, os resultados sugerem que o estresse no início da vida induz alterações negativas no desenvolvimento de ratos, evidenciado por comportamento depressivo na vida adulta. Além disso, a PM aumentou a ativação microglial nas fases precoces e tardias do desenvolvimento. Os níveis de GFAP e IDO diminuíram nos estágios iniciais, mas foram aumentados em períodos tardios. Esses achados sugerem que a PM pode afetar diferencialmente a expressão da enzima

IDO, além das células astrocitárias e microgliais. O início de um estado inflamatório a partir de células cerebrais pode estar associado à ativação da via da quinurenina, através da expressão alterada de IDO, e ao desenvolvimento do comportamento depressivo na idade adulta.

Palavras-chave: Imunorreatividade da proteína glial fibrilar ácida; ativação microglial; indoleamina 2 3-dioxigenase; privação materna; transtorno depressivo maior.

ABSTRACT

Studies have shown that exposure to an adverse early life environment may underlie a vulnerability to the later development of major depressive disorder (MDD). Maternal deprivation (MD) induces behavioural changes and impacts brain circuits that could be associated with the pathophysiology of MDD. Thus, this study was aimed at investigating the roles that microglia, astrocytes, and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) play in developmental programming after early life MD. Immobility times in the forced swimming test (FST) were evaluated on postnatal days (PND) 20, 30, 40, and 60. Immunohistochemistry was used on PND 10, 20, 30, 40, and 60 to investigate hippocampal MD-induced changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of expressed astrocyte, and ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (Iba-1), a marker of expressed microglia. Also, on the same PND, we used real time RT-PCR to investigate MD-induced changes in the expression of GFAP, IDO, and allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) (a marker of expressed microglia) within the frontal cortex (FC) and hippocampus. There was no alteration in the immobility times on PND 20, 30, or 40. However, on PND 60, the rats that were subjected to MD displayed a depressive-like behaviour as demonstrated by an increase in the immobility time. The levels of GFAP immunopositive cells did not change on PND 10 or 30. On PND 20, the levels of GFAP immunopositive cells were found to have decreased in rats that had been subjected to MD. An increase in the expression of GFAP immunopositive cells was observed on PND 40 and 60 in maternally deprived rats. The levels of Iba-1 were found to have increased on PND 10, 20, and 30. There was no change in the levels of Iba-1 immunopositive cells on PND 40 or 60. IDO expression was reduced in the hippocampus on PND 10, and elevated within the FC on PND 60 following MD. GFAP expression by RT-PCR decreased in the FC on PND 10, and was found to have increased in the hippocampus on PND 60 in the maternally deprived rats. AIF-1 expression increased in the FC on PND 20 and 60 following MD. In summary, these results suggest that early life stress induces negative developmental programming in rats, marked by depressive-like behaviour in adult life. Moreover, MD increases the levels of microglial activation in early and late developmental phases. Levels of GFAP and IDO decreased in the early stages, but were found to be higher in later developmental periods. These findings suggest that maternal deprivation could differentially affect the expression of the IDO enzyme, beyond astrocyte and

microglial cells. The onset of an inflammatory state from resident brain cells could be associated with the activation of the kynurenine pathway, through the altered expression of IDO, and the development of depressive behaviour in adulthood.

Keywords: Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity; microglial activation; indoleamine 2 3-dioxygenase; maternal deprivation; major depressive disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação microglial (Iba-1- marcador de atividade microglial) pelo estresse ocasionaria a liberação de citocinas e fatores inflamatórios (TNF α - fator de necrose tumoral, IL-6- interleucina 6, IL-1 β - interleucina 1 β), ativando a IDO (indoleamina 2,3 dioxigenase) e por consequência diminuição da concentração serotoninérgica (5-HT-serotonina), além de favorecer a atrofia de astrócitos, contribuindo para neurotoxicidade por alterações no metabolismo glutamatérgico.	43
Figura 2 - Linha de tempo do estudo: Ratos Wistar machos foram submetidos ao protocolo de PM durante os 10 primeiros dias de vida. Posteriormente, diferentes grupos de animais (privado e controle) nos dias 20,30, 40 e 60 após o nascimento foram expostos ao teste comportamental (teste do nado forçado) e então amostras de cérebro foram dissecadas para a análise de marcadores gliais e da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) nos dias 10, 20, 30, 40 e 60 após o nascimento, respectivamente.	48
Figura 3 - Efeitos da PM no tempo de imobilidade de ratos submetidos ao TNF nos dias 20, 30, 40 e 60 após o nascimento. Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=12). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	49
Figura 4 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 10. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	50
Figura 5 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 20. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	51
Figura 6 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 30. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	52
Figura 7 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 40. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	52
Figura 8 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 60. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	53

Figura 9 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 10. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	54
Figura 10 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 20. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	54
Figura 11 - Efeitos da privação materna em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 30. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	55
.....	55
Figura 12 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 40. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	55
Figura 13 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 60. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t <i>Student</i>	56
Figura 14 - Efeitos da privação materna na expressão gênica de IDO do hipocampo e CF em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 (E) DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$, diferente de não privados, de acordo com o teste t de <i>Student</i>	57
Figura 15: Efeitos da privação materna na expressão gênica de GFAP no CF e no hipocampo em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 (E) DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$, diferente de não-privado, de acordo com o teste t de <i>Student</i>	58
Figura 16 - Efeitos da privação materna na expressão gênica de AIF-1 no CF e no hipocampo em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 (E) DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$, diferente de não privados, de acordo com o teste t de <i>Student</i>	60
Figura 17 - Relação entre a ativação microglial, com liberação de citocinas (azul), ativação astrocitária, neurônio pré e pós-sináptico. Possivelmente ocasionando uma alteração na disponibilidade de neurotransmissores: serotonina (cinza) e glutamato (vermelho).	65

Figura 18 - Representação da ativação de IDO, com desvio do triptofano para via das quinurinininas, diminuição serotoninérgica e ativação do receptor NMDA. 67

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Primers de RT-qPCR incluídas no estudo.....	47
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
1.2 MICRÓGLIA, ASTRÓCITO E TDM.....	37
1.3 A VIA DA QUINURENINA E TDM.....	41
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3 METODOLOGIA	45
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	45
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE CUIDADOS MATERNOS	45
3.3 TESTE DO NADO FORÇADO (TNF)	46
3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	46
3.4.1 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real (RT-QPCR).....	46
3.4.2 Iba-1 e GFAP por imuno-histoquímica	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
3.6 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NO TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NADO FORÇADO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO.....	49
3.7 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NOS MARCADORES DE ASTRÓCITOS (GFAP) POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	49
3.9 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NO MARCADOR DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL (IBA-1) POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
3.10 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA EM IDO, GFAP E AIF-1 EXPRESSÃO NO CF E HIPOCAMPO	56
4 DISCUSSÃO.....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	80
ANEXO I – CERTIFICADO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	81

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios mentais constituem uma porcentagem elevada de problemas de saúde pública (Ménard et al., 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS), alerta que cerca de 10% da população global, sofre com algum tipo de transtorno mental em todo o mundo, representando aproximadamente 700 milhões de pessoas. O transtorno depressivo maior (TDM) é uma das formas mais comuns de transtornos do humor, afetando cerca de 350 milhões de pessoas (GBD, 2015), sendo o TDM associado a um sofrimento considerável para os indivíduos e suas famílias.

O TDM apresenta uma prevalência durante a vida de 2% a 15%, sendo um dos fatores de risco mais importantes para a incapacidade (OMS, 2012). Além disso, o grau de comprometimento físico e social, o uso considerável de recursos de cuidados de saúde entre pacientes com TDM, é comparável apenas à doença cardíaca crônica. Os sintomas do TDM incluem o humor deprimido, perda de concentração e anedonia, bem como mudanças no apetite e no sono (Nestler et al., 2002).

O tratamento do TDM geralmente assume a forma de antidepressivos e ou psicoterapias, conforme a gravidade da patologia. O tratamento medicamentoso é baseado na regulação de neurotransmissores monoaminérgicos, como a serotonina e a dopamina. Embora o tratamento da depressão seja geralmente seguro e eficaz, está longe de ser ideal. Apesar da diversidade de fármacos para o tratamento do TDM, os tratamentos disponíveis estão aquém do ideal (Machado-Vieira, 2010). Isso está relacionado ao fato de que o período de resposta terapêutica para que se obtenham os primeiros benefícios clínicos é longo, sendo compreendido entre 3-5 semanas (Juli e Juli, 2014). É importante notar que um risco aumentado de suicídio não é incomum durante o primeiro mês de tratamento e quando ocorre, parece ser devido a melhora dos sintomas em etapas, isto é, a energia física melhora primeiro, enquanto a resolução do humor depressivo e pensamentos negativos é um processo mais

gradual.

Estima-se que cerca de um milhão de pessoas cometem suicídio a cada ano, resultando em 3.000 óbitos por dia (OMS, 2012). É importante salientar que menos de um terço dos pacientes com TDM obtiveram remissão usando um único antidepressivo padrão após a décima quarta semana de tratamento (Trivedi, 2006), tornando o TDM uma condição crônica e recorrente para muitos pacientes (Krishnan e Nestler, 2008). Além disso, aproximadamente 30-50% dos pacientes não respondem a nenhum dos antidepressivos clássicos (Krishnan e Nestler, 2008). Muitas estratégias vêm sendo propostas para pacientes depressivos que não respondem aos tratamentos clássicos, como o aumento da dose do antidepressivo, uso de hormônios tireoideanos, combinação de dois antidepressivos (farmacoterapia combinada), combinação de antidepressivos com outras medicações de perfis farmacológicos diferentes, além da substituição por outra classe de antidepressivos (Anderson, 2000). Bem como diversas técnicas psicoterápicas.

A etiologia do TDM ainda é desconhecida. Acredita-se em uma origem multifatorial, interação entre fatores genéticos, neurobiológicos e fatores ambientais (Jespersen et al., 2013). Além disso, a qualidade do ambiente de vida, como a exposição a eventos estressantes estão entre os fatores mais relevantes que determinam o aparecimento do TDM (Davidson e McEwen, 2012). Essa natureza heterogênea da depressão tem gerado várias hipóteses difíceis de elucidar a causa desta patologia.

Historicamente, a hipótese da deficiência monoaminérgica vem sendo usada como explicação para os sintomas depressivos, postulando a diminuição de neurotransmissores na fenda sináptica (Schildkraut, 1995; Delgado, 2006; Berton e Nestler, 2006). Porém, ainda são necessárias mais pesquisas para encontrar novos tratamentos devido à reposta insatisfatória a medicamentos antidepressivos clássicos, como os inibidores da recaptação de serotonina (ISRS) e ao grande índice de pacientes refratários ao tratamento (Trivedi et al., 2008). Em função dessa

situação, muitos estudos vêm propondo que outras vias estejam relacionadas com a neurobiologia do TDM. Muitos desses estudos destacam o papel de outros sistemas de neurotransmissores, como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Réus et al., 2015b; Gulyaeva, 2017; Zhu et al., 2017). Além disso, a sinalização de cascatas intracelulares que regulam a expressão de genes envolvidos com a neuroplasticidade e a sobrevivência de células neuronais parecem ser importantes alvos no tratamento e fisiopatologia do TDM (Ignácio et al., 2017).

1.1 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E TDM

A interação mãe-bebê parece demonstrar igual importância quando comparada a qualquer outra necessidade fisiológica do bebê (Winnicott, 1964). A necessidade da criança de encontrar disponibilidade por parte do adulto estabelecerá progressivamente um vínculo seguro, estruturando um *self* autoconfiante, capaz de fazer frente a situações de estresse, percebendo o mundo externo de forma confiável. Inversamente, o não estabelecimento de um vínculo seguro leva à construção de um *self* frágil, com a percepção de um mundo externo hostil. Quanto mais jovem, mais vulnerável o indivíduo parece ser a eventos traumáticos (Zavaschi et al., 2002).

Cada experiência ao longo do desenvolvimento é importante para a consolidação da maturidade emocional. O ambiente neonatal precoce tem um profundo impacto no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Os estímulos ambientais interagem com o modelo genético, moldando fenótipos individuais e sua subsequente percepção e reatividade a vários desafios. Evidências básicas, clínicas e epidemiológicas apoiam a noção de que a exposição a ambientes adversos no início da vida pode estar subjacente a uma vulnerabilidade e posterior manifestação do TDM (Ignácio et al., 2017). O início do TDM tende a ser precoce para aqueles que sofreram adversidades na infância (Widom et al., 2007). Além

disso, na prole, a perda materna tende a ter uma maior associação com distúrbios psiquiátricos do que com a perda paterna (Brown e Copeland 1977; Kunugi, 1995). Estudos evidenciam que mais de 30% dos transtornos mentais estão diretamente relacionados ao estresse precoce, incluindo transtornos de ansiedade e transtornos do humor (Afifi et al., 2008).

A privação materna (PM) se apresenta como modelo para induzir comportamentos depressivos em roedores e também para estudar os efeitos de estresse precoce e seu impacto no desenvolvimento. Estudos recentes demonstraram que os ratos separados de suas mães durante os primeiros 10 DPN apresentam alterações comportamentais e cerebrais que persistem na idade adulta, evidenciando alterações cerebrais como diminuição dos níveis de neurotrofinas e aumento dos níveis periféricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) na idade adulta (Réus et al., 2011; Réus et al., 2015a).

Neurotrofinas que são importantes para a sobrevivência neuronal e a neuroplasticidade, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e o fator de crescimento neural (NGF), foram reduzidas no cérebro de ratos submetidos à PM (Reus et al., 2011). Ainda nesse sentido, tratamento com cetamina, um antagonista do N-metil-D-aspartato (NMDA), melhorou o comportamento do tipo depressivo induzido pela PM, além de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Réus et al., 2015c), estresse oxidativo e comprometimento do metabolismo energético (Réus et al., 2015a, 2015b). Em outro estudo, a cetamina e a quetiapina, um antipsicótico, regularam as alterações epigenéticas observadas nas estruturas cerebrais que foram relacionadas ao TDM em ratos adultos que foram submetidos à PM (Réus et al., 2013; Ignácio et al., 2017), indicando a presença de outras alterações cerebrais, além das monoaminérgicas, na fisiopatologia do TDM.

Estudos envolvendo a PM em ratos fornecem indícios

claros de que a exposição a eventos adversos nas fases iniciais do desenvolvimento resulta em reatividade exagerada ao estresse e alterações em vários circuitos neurais que persistem na idade adulta (Ménard et al., 2017). Em áreas cerebrais específicas de pacientes deprimidos, como hipocampo, pode ser encontrada perda neuronal, a qual parece correlacionar-se positivamente com alterações no balanço de citocinas inflamatórias na periferia (Miller et al., 1998; Nishida et al., 2002; Szelényi et al., 2007). No entanto, estudos ainda são necessários para investigar os mecanismos pelos quais o estresse no início da vida parece atuar como desencadeador de condições psiquiátricas ao longo do desenvolvimento. Uma relação que vem sendo estudada é a capacidade de ativação microglial e o desenvolvimento de sintomas depressivos. De fato, foram evidenciadas alterações dinâmicas na micróglia, frente à exposição ao estresse que por sua vez, produzem comportamento do tipo depressivo em roedores. Estas células podem modificar suas características e funções de acordo com estímulos ambientais, que de acordo com o contexto poderiam resultar como benéficas ou prejudiciais (Kierdorf e Prinz, 2013; Siskova e Tremblay, 2013).

1.2 MICRÓGLIA, ASTRÓCITO E TDM

A ativação do sistema inflamatório na depressão está bem documentada (Maes et al., 1992; Muller et al., 1993; Maes et al., 1994; Rothermundt et al., 2001; Myint et al., 2005). As respostas imunológicas a nível do sistema nervoso central são reguladas por dois tipos celulares, a micróglia e os astrócitos, os quais desempenham papéis inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente (Gao e Hong, 2008). Os astrócitos, além de fazerem parte dos sistemas imune e inflamatório, encontram-se em uma localização estratégica, em estreito contato com as células do SNC: neurônios, micróglia, oligodendrócitos e astrócitos. Essas células apresentam como função o armazenamento, o transporte e a liberação de

neurotransmissores (Gao e Hong, 2008), por exemplo, o glutamato, o qual é transportado ativamente pelos astrócitos (Aronica et al., 2003). Os principais ativadores dos astrócitos são mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α , interferon- γ (IFN- γ), IL-1 e IL-6 (Farina et al., 2007). O número e função das micróglia parecem ser controlados pelo microambiente local. Estas células do sistema imunológico dotadas de receptores podem detectar mudanças ambientais sob uma escala de tempo de minutos e responder realizando diversas funções, que de acordo com o contexto, poderiam resultar como benéficas ou prejudiciais (Kierdorf e Prinz, 2013; Siskova e Tremblay, 2013) na interface de estímulos ambientais e consequentemente mudanças em sua função, sugerindo-se que as micróglia poderiam estar por trás da interação entre estímulos ambientais e vulnerabilidade ao TDM.

Ratos expostos ao estresse apresentaram modificações na micróglia, principalmente no giro dentado do hipocampo (Muller, 2014). As células microgliais parecem responder às experiências sensoriais e comportamentais de privação de estímulos visuais, enriquecimento ambiental, modulando suas interações com os circuitos neuronais (Ekdahl, 2012; Reshef et al., 2014). Foi demonstrado que em uma exposição ao estresse por curto prazo (1-2 dias) houve uma proliferação e ativação da micróglia, com aumento da ativação e expressão de marcadores, tais como IL-1/IL-1R (Muller, 2014). Além disso, os autores descobriram que a exposição crônica ao estresse (5 semanas) leva a uma diminuição do número de células, diminuição da expressão de marcadores microgliais como o Iba-1 e CD11b (Muller, 2014).

As citocinas também seriam capazes de ativar células gliais, que por sua vez, produziriam mais citocinas pró-inflamatórias por mecanismos de *feedback* (Muller et al., 1998). Para entendimento da relação entre ativação microglial e comportamento depressivo foi postulado o modelo de sinapse quadri-partite, onde a relação entre os neurônios pré e pós-

sinápticos seria acrescida da presença de astrócitos e micróglia, que atuariam modulando ou regulando a presença de neurotransmissores (Gomes et al., 2013).

O processamento de informação em sinapses não é apenas definido por neurônios, mas também por astrócitos, e micróglia, que interagem dinamicamente com sinapses de maneira dependente. Os astrócitos regulam o potássio e os níveis basais de glutamato, definindo a excitabilidade basal dos neurônios. Os níveis extracelulares de glutamato contribuem para definir a densidade de receptores NMDA e ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico (AMPA) na membrana plasmática do compartimento pós-sináptico, que desencadeiam e sustentam alterações da plasticidade sináptica, respectivamente (Rial et al., 2016). Demonstrando que a atuação de vários elementos é responsável pela homeostase do ambiente sináptico.

Células microgliais geralmente são as primeiras a serem envolvidas na reposta do dano tecidual ou infecções cerebrais (Stertz et al., 2013). Essas células possuem uma série de funções, tais como, o reconhecimento de patógenos, fagocitose, apresentação de antígenos, remodelação de sinapse, entre outros (Boche et al., 2013). A ativação microglial pode ser dividida em dois tipos: clássica M1 e uma ativação alternativa M2. Na ativação M1, as células da micróglia podem ficar extremamente ramificadas ou de forma amebóide/fagocítica (Boche et al., 2013), além de sintetizarem moléculas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), TNF- α , IL-6 e outras, radicais superóxidos, glutamato, óxido nítrico (NO), e também neutralizar infecções e fazer o reparo de lesões teciduais (Barger et al., 2007; Takaki et al., 2012). A M2 pode ser ativada pelas citocinas IL-4, IL-13 ou IL-25 (Boche et al., 2013; Maiorino et al., 2013), e sua ativação está associada com a liberação de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo IL-10, fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) e fatores neurotróficos

(Ekdahl, 2012; Boche et al., 2013; Hu et al., 2015), que irão facilitar o processo de cura e também limitar a lesão neuronal (Najjar et al., 2013).

Quando o cérebro sofre alterações em sua plasticidade, ele pode ficar mais suscetível ao estresse por interrupção das interações das células gliais (Tynan et al., 2013). De fato, a hiperamifificação microglial e a atrofia de astrócitos no córtex pré-frontal acontecem pela exposição ao estresse crônico (Tynan et al., 2013).

Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC, incluindo manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, alterados com a descarga de potenciais de ação dos neurônios; captação e liberação de diversos neurotransmissores, tendo um papel crítico no metabolismo dos neurotransmissores, glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico); participação na formação da barreira hematoencefálica; secreção de fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios, direcionamento de axônios e formação e funcionamento das sinapses (Gomes et al., 2013). Entre as características gerais dos astrócitos maduros destaca-se a presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP); a proteína ligadora de cálcio, S-100 beta e a enzima conversora de glutamato em glutamina, glutamina sintetase (Gomes et al., 2013).

Evidências recentes demonstram que astrócitos de algumas regiões do SNC, como hipocampo, também podem contribuir para a gênese celular no sistema nervoso adulto atuando tanto como célula-tronco como gerando nichos neurogênicos permissivos à sobrevivência de progenitores neuronais e gliais (Gomes et al., 2013). Estudos sugerem um papel importante para AIF-1 em processos inflamatórios, sendo produzido por monócitos, macrófagos e linfócitos e sua síntese

é mediada por várias citocinas, como IFN- γ (GBD, 2015, Ménard et al., 2017). AIF-1 é um modulador de resposta imune durante a ativação dos macrófagos. Parece também desempenhar um papel na sobrevivência e atividade pró-inflamatória de macrófagos (Pawlik et al., 2015). A molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (IBA1) é uma proteína que em seres humanos é codificada pelo gene AIF1. Este gene codifica uma proteína que liga actina e cálcio.

É induzido por citocinas e interferons e pode promover a ativação de macrófagos e o crescimento de células musculares lisas vasculares e linfócitos T. Os polimorfismos neste gene podem estar associados à esclerose sistêmica (Yan-Ying et al., 2013).

1.3 A VIA DA QUINURENINA E TDM

Pesquisas já demonstraram que o glutamato, um neurotransmissor do SNC com um papel importante na fisiopatologia da depressão, tem relação direta com a neurotoxicidade microglial (Piani et al., 1992; Barger e Basile, 2001). As citocinas inflamatórias possuem a capacidade de diminuir a expressão dos transportadores de glutamato e aumentar a liberação de glutamato pelos astrócitos (Miller, 2013). Além disso, as citocinas inflamatórias ativam a microglia que, consequentemente, pode induzir a liberação de glutamato que contribui com o dano neuronal durante a neuroinflamação (Barger et al., 2007).

A liberação vesicular de glutamato a partir de astrócitos acontece pela ação das citocinas, ativando receptores pré-sinápticos, como o NMDA (Santello; Volterra, 2012) e estimulando a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que é responsável pela degradação de triptofano (TRP) e um potente agonista do NMDA pela liberação de glutamato (Miller et al., 2009). A IDO também é capaz de ativar genes pró-inflamatórios que aumentam ainda mais a neuroinflamação, gerando um ciclo vicioso (Réus et al., 2015a). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias aumentam a atividade enzimática da IDO levando à degradação do TRP na via da quinurenina (Miller et al., 2016). Dessa forma o envolvimento da via das quinureninas na fisiopatologia do TDM fica evidenciado. O TRP pode ser metabolizado em serotonina, ou pode seguir a via de quinurenina através da ação de 2,3-dioxigenase (IDO) ou IDO em quinurenina (KYN) (Morris et al., 2017; Leklem, 1971). No

entanto, KYN não é neuroativo; Quando KYN é hidroxilado por quinurenina-3-monooxigenase (KMO) em 3- hidroxiquinurenina (3-OHK), pode seguir outras vias e ser convertido em um dos geradores de radicais livres, 3- hidroxiquinurenina ou ácido 3-hidroxiantranílico, bem como no ácido quinolínico (QUIN), que é um agonista do receptor NMDA (Guillemin et al., 2001). Além disso, KYN pode ser convertido em ácido quinurínico (KYNA) dentro de astrócitos (Lopresti et al., 2014) com QUIN e KYNA aparentemente neurotóxicos. KYNA é um antagonista do receptor de acetilcolina $\alpha 7$ nicotínico ($\alpha 7nAChR$) (Kessler et al., 1989) e do receptor de NMDA (Konradsson-Geuken et al., 2001). Os sintomas depressivos em pacientes que receberam tratamento com IFN- α foram correlacionados com níveis aumentados de KYN, QUIN e KYNA no SNC (Raison et al., 2009). Em um estudo populacional, foi encontrada uma relação entre a ativação periférica de IDO e sintomas depressivos (Elovainio et al., 2012). O equilíbrio dos metabólitos da via das quinureninas é essencial para sustentar funções cerebrais normais (Parasram et al., 2017). De fato, os metabólitos da via das quinureninas podem se tornar fontes de estresse oxidativo, o que parece estar envolvido com a fisiopatologia do TDM (Fraguas et al., 2017). A Figura 1 representa a relação entre a ativação microglial, liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β que ativam a IDO, culminando com a diminuição dos níveis serotoninérgicos e aumento do estresse oxidativo, além disso, os astrócitos apresentam uma atrofia e alteração em sua função regulação do metabolismo do glutamato, o que, como já descrito, contribuiria para uma neurotoxicidade.

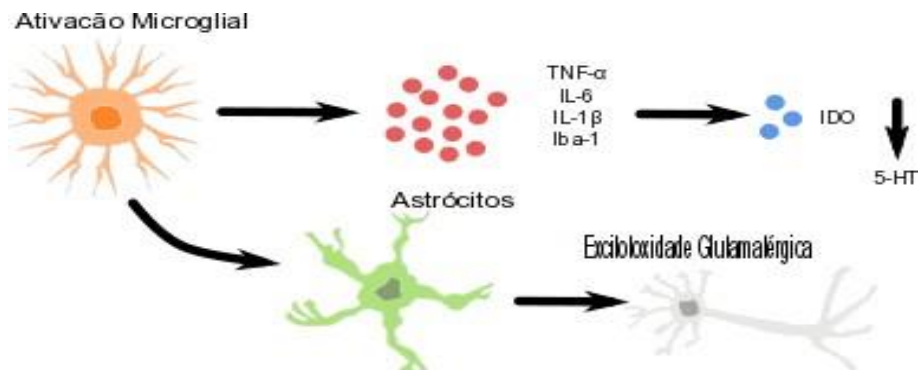


Figura 1 - Ativação microglial (Iba-1- marcador de atividade microglial) pelo estresse ocasionaria a liberação de citocinas e fatores inflamatórios ($\text{TNF}\alpha$ - fator de necrose tumoral, IL-6- interleucina 6, IL-1 β - interleucina 1 β), ativando a IDO (indoleamina 2,3 dioxigenase) e por consequência diminuição da concentração serotoninérgica (5-HT-serotonina), além de favorecer a atrofia de astrócitos, contribuindo para neurotoxicidade por alterações no metabolismo glutamatérgico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações comportamentais, marcadores gliais e atividade da enzima IDO em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento do tipo depressivo através do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.
- Avaliar a ativação de GFAP (expressão de atividade astrocitária) em tecido cerebral em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.
- Avaliar a ativação de Iba-1(expressão de atividade microglial) em tecido cerebral em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.
- Avaliar a ativação de AIF-1 (expressão de atividade microglial) em tecido cerebral em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.
- Avaliar a ativação da enzima IDO em tecido cerebral em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo, ratos Wistar fêmeas (três meses de idade, pesando 250-280 g) foram obtidos da colônia de criação da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC, Criciúma, SC, Brasil) e foram alojados por uma semana na presença de machos para fins de acasalamento. No final de sete dias, as ratas grávidas foram alojadas individualmente com acesso *ad libitum* aos alimentos e à água. As ratas grávidas foram alojadas individualmente para o nascimento dos filhotes e sua identificação. Todas as mães e prole foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de doze horas, a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os filhotes machos foram usados durante o período de PM. Um dia após o parto, foi aplicado o protocolo de PM a 50% dos filhotes nos dias 1-10 após o nascimento. Outros machos foram usados como controles. Todos os procedimentos experimentais que envolvem animais foram realizados de acordo com o Guia NIH para Uso de Animais de Laboratório, nas recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para cuidados com animais e com a aprovação do Comitê de Ética local sob o protocolo número 058/2016-1.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE CUIDADOS MATERNOS

O protocolo de privação consistiu em remover a mãe da caixa residência e levá-la para outra sala. Os filhotes foram mantidos em sua gaiola (agrupados no ninho na presença de odor materno). Os filhotes foram privados da mãe três horas por dia durante os primeiros 10 dias. Preferiu-se esse protocolo de PM por não requer a manipulação dos filhotes (Kosten et al., 2009; Mello, 2009). No final de cada sessão diária de privação, as mães foram devolvidas às caixas residência. Este procedimento foi realizado durante as manhãs, entre às 8:00 da manhã e 12:00 horas. Os ratos controle permaneceram em suas caixas residência junto com suas mães durante todo o experimento.

Após o protocolo de PM, diferentes grupos de animais (privados e não privados (controles)) foram submetidos às análises bioquímicas e a testes comportamentais (Réus et al., 2017). No DPN (dias pós nascimento) 10 (infância), um grupo de ratos ($n = 6$ privados e $n = 6$ não privados, total = 12 ratos) foi morto e retirado o cérebro para realização de testes bioquímicos. Nos DPN 20, 30, 40 e 60 (adolescência, adulto

jovem e adulto, respectivamente), diferentes animais ($n = 12$ privados, $n = 12$ não privados para cada fase, total = 96 ratos) foram submetidos a testes comportamentais como descrito na seção métodos e figura 2. Após os testes comportamentais, os ratos foram mortos e, em seguida, as amostras de cérebro foram utilizadas para análises bioquímicas.

3.3 TESTE DO NADO FORÇADO (TNF)

O TNF foi conduzido de acordo com estudos anteriores (Porsolt et al., 1977; Réus et al., 2011). O teste envolve duas exposições individuais a um tanque cilíndrico cheio de água, no qual os ratos não podem tocar o fundo do tanque ou escaparem. O tanque é feito de acrílico transparente, com 80 cm de altura, 30 cm de diâmetro e cheio com água ($22-23^{\circ}\text{C}$) até uma profundidade de 40 cm. Nos DPN 20, 30, 40 e 60, os ratos foram colocados individualmente no cilindro contendo água durante 15 min (sessão pré-teste). Nos DPN 21, 31, 41 e 61 os ratos foram novamente submetidos ao TNF por uma sessão de 5 minutos (sessão de teste), e o tempo de imobilidade foi registrado em segundos.

3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.4.1 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real (RT-QPCR)

O RNA total foi isolado com reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria ($A_{260/280\text{ nm}}$) e após tratamento com Deoxyribonuclease I (Invitrogen) para eliminar a contaminação do DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado com ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) de 1 µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. A PCR quantitativa foi realizada utilizando SYBR® Green I (Invitrogen) para detectar a síntese de cDNA de cadeia dupla. As reações foram feitas em um volume de 25 µL usando 12,5 µL de cDNA diluído, contendo uma concentração final de 0,2 x SYBR® Green I (Invitrogen), 100 µM dNTP, 1x PCR tampão, 3 mM de MgCl_2 0,25 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 200 nM de cada iniciador reverso usado: GFAP, AIF-1 e IDO (Tabela 1). As condições de ciclagem de PCR foram: um passo inicial de ativação da polimerase durante 5 min a 95°C , 40 ciclos de 15 s a 95°C para desnaturação, 35 s a 60°C para recozimento e 15 s a 72°C para alongamento. No final do

protocolo de ciclagem, foi incluída uma análise da curva de fusão e a fluorescência mediu 60 a 99 °C e mostrou em todos os casos um único pico. GAPD foi usado como genes de referência para a normalização. Os níveis de expressão relativa foram determinados com 7.500 Software de detecção de sequência de sistema em tempo real rápido v.2.0.5 (Applied Biosystems). Os níveis relativos de expressão de mRNA foram determinados utilizando o método alvo / GAPDH e foram medidos no CF e hipocampo. (Primers estão descritos na Tabela 1).

Tabela 1 - Primers de RT-qPCR incluídas no estudo

GAPDH	SENS: GAACATCATCCCTGCATCCA REVS: GCCAGTGAGCTTCCCCTTCA
GFAP	SENS: CAGACTTTCTCCAACCTCCAG REVS: CTCCTGCTTCGAGTCCCTTAATG
AIF-1	SENS: GCCTCATCGTCATCTCCCCA REVS: AGGAAGTGCTTGTTGATCCCCA
IDO	SENS: CCTGACTTATGAGAACATGGACGT REVS: ATACACCAGACCGTCTGATAGCTG

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

3.4.2 Iba-1 e GFAP por imuno-histoquímica

Para caracterizar a ativação microglial e astrocitária no hipocampo, realizou-se a imuno-histoquímica (IH). Em resumo, as secções de 40 µm do hipocampo foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 0,5% em PBS 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,3% de Triton-X100 (PBST) durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após a lavagem com PBST, as secções foram incubadas durante 30 min com PBST contendo 2% de albumina de soro bovino para bloquear a ligação de proteína não específica. As secções foram então incubadas durante a noite a 4 °C com um anticorpo IgG monoclonal de coelho contra Iba-1 (1: 100 de diluição) ou anticorpo policlonal de coelho contra GFAP (diluições 1: 200, Abcam, Cambridge, MA), após a lavagem com PBST, secções foram incubados à temperatura ambiente durante 1 h com IgG anti-coelho biotilado (diluição 1: 100, Abcam). As secções

foram incubadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Spring Bioscience). Dezesseis imagens aleatórias por seção cerebral foram adquiridas em uma ampliação de $\times 100$ e a área imunopositiva foi expressa como porcentagem da área total analisada. A análise da densitometria dos filmes foi realizada usando o software de análise de imagem: Image Jv.1.34. Foram utilizados controles positivos em todos os grupos, de acordo com a folha de dados de cada anticorpo.

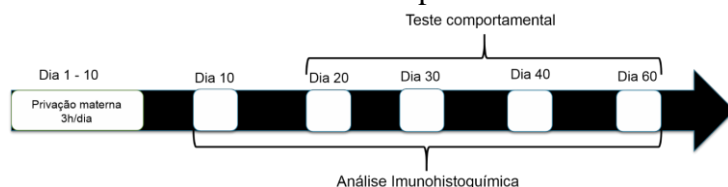


Figura 2 - Linha de tempo do estudo: Ratos Wistar machos foram submetidos ao protocolo de PM durante os 10 primeiros dias de vida. Posteriormente, diferentes grupos de animais (privado e controle) nos dias 20, 30, 40 e 60 após o nascimento foram expostos ao teste comportamental (teste do nado forçado) e então amostras de cérebro foram dissecadas para a análise de marcadores gliais e da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) nos dias 10, 20, 30, 40 e 60 após o nascimento, respectivamente.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo teste *T Student* e expressos como média e erro padrão da média. Consideraram-se significativos os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no software estatístico SPSS versão 21.0. RESULTADOS

3.6 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NO TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NADO FORÇADO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO

O comportamento depressivo em ratos submetidos à privação materna está ilustrado na figura 3. Nos ratos submetidos à privação materna o tempo de imobilidade não foram alterados em 20, 30 e 40 DPN ($t = 1,077$; $df = 22$; $p = 0,293$; $t = 1,538$; $df = 18$; $p = 0,141$; $t = 0,734$; $df = 27$; $p = 0,469$, respectivamente). No entanto, aos 60 DPN revelou-se um aumento no tempo de imobilidade de ratos privados ($t = -3.063$; $df = 16$; $p = 0,007$) Figura 3.

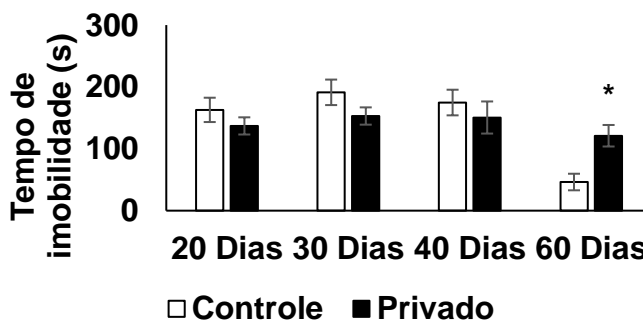


Figura 3 - Efeitos da PM no tempo de imobilidade de ratos submetidos ao TNF nos dias 20, 30, 40 e 60 após o nascimento. Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n=12$). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste *t Student*.

3.7 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NOS MARCADORES DE ASTRÓCITOS (GFAP) POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

As figuras 4 a 8 demonstram a reatividade de astrócitos no hipocampo pela técnica de imuno-histoquímica. Não houve alteração na reatividade de astrócitos identificada pelas células imunopositivas para GFAP nos dias 10 e 30 após o nascimento, seguidos de PM ($t = 2,31$; $df = 8$; $p = 0,05$; Fig. 4; $t = 1,22$; $df = 4$; $p = 0,288$; Fig. 6, respectivamente). Neste estudo foi demonstrada uma redução de células imunopositivas de GFAP no dia 20 após o nascimento de ratos que foram privados ($t = 2,85$; $df = 4$; $p = 0,046$; Fig. 5). Entretanto, nos dias 40 e 60 após o nascimento foi demonstrado um aumento na reatividade de astrócitos identificados

pelas células imunopositivas de GFAP no hipocampo de ratos expostos ao estresse neonatal ($t = 5,51$; $df = 4$; $p = 0,005$; Fig. 7; $t = 6,39$; $df = 4$; $p = 0,003$; Fig. 8, respectivamente).

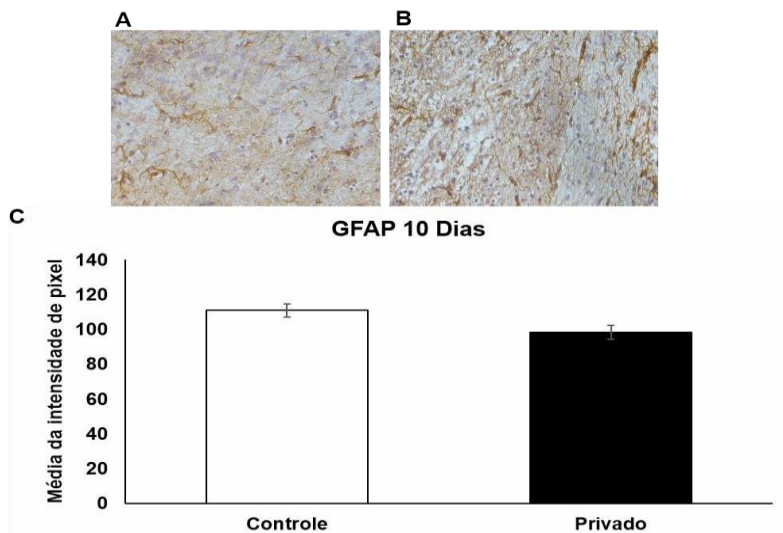


Figura 4 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 10. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

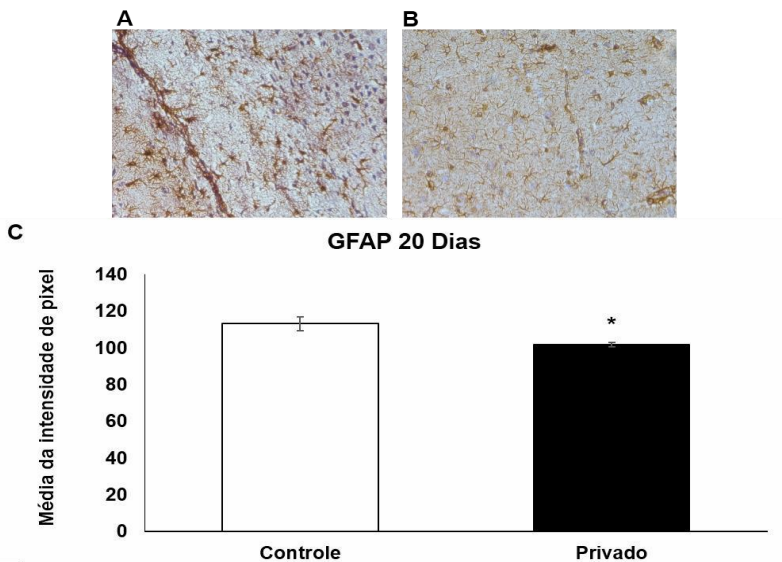


Figura 5 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 20. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste *t Student*

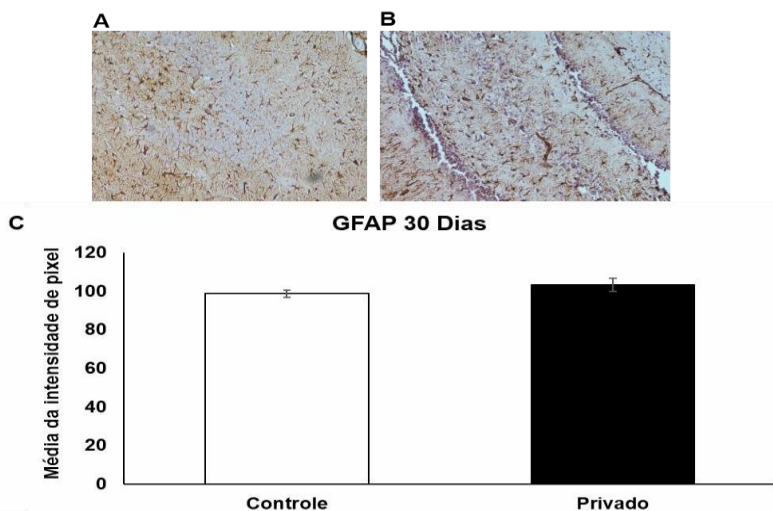


Figura 6 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 30. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste *t Student*.

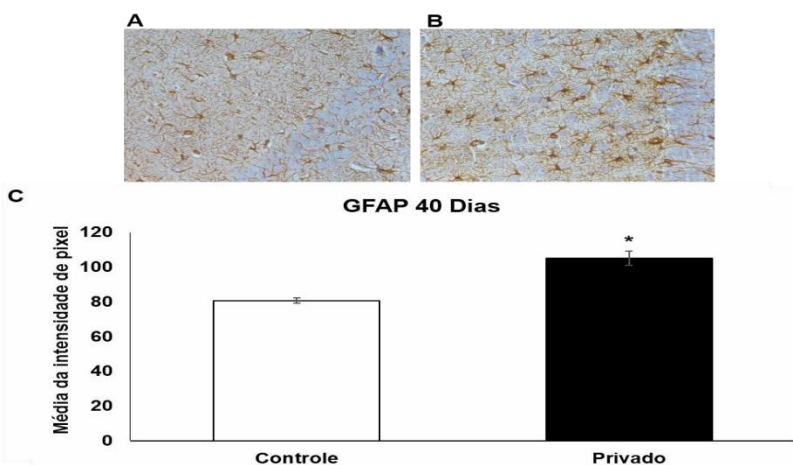


Figura 7 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 40. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste *t Student*.

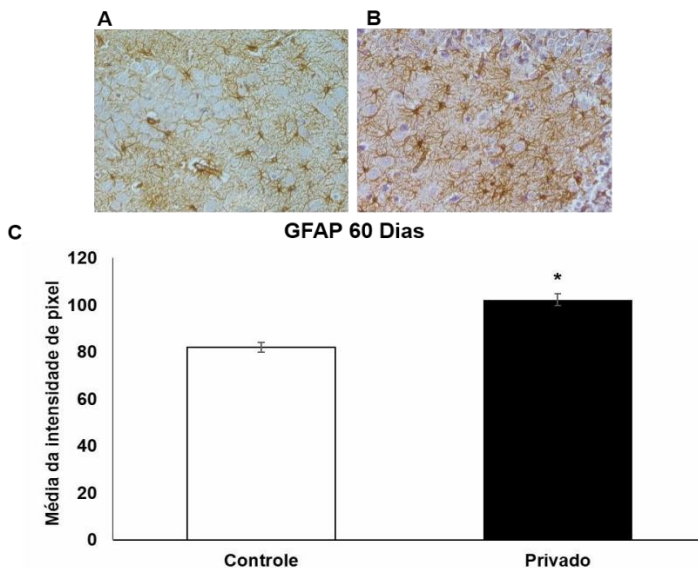


Figura 8 - Efeitos da PM em células imunopositivas para GFAP no hipocampo no DPN 60. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*

3.9 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA NO MARCADOR DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL (IBA-1) POR IMUNOHISTOQUÍMICA

As figuras 9 a 13 ilustram a ativação microglial pelo marcador Iba-1. Nos 10, 20 e 30 DPN de ratos que foram privados, foi observado um aumento de células imunopositivas para Iba-1, indicando ativação microglial no hipocampo desses ratos ($t = 6,95$; $df = 11$; $p < 0,0001$; Fig. 9; $t = 6,57$; $df = 4$; $p = 0,003$; Fig. 10; $t = 6,26$; $df = 3$; $p = 0,008$; Fig. 11). Nenhuma alteração foi encontrada nas células imunopositivas para Iba-1 nos animais privados de 40 e 60 dias após o nascimento ($t = 0,064$; $df = 6$; $p = 0,951$; Fig. 12; $t = 0,921$; $df = 3$; $p = 0,425$; Fig. 13).

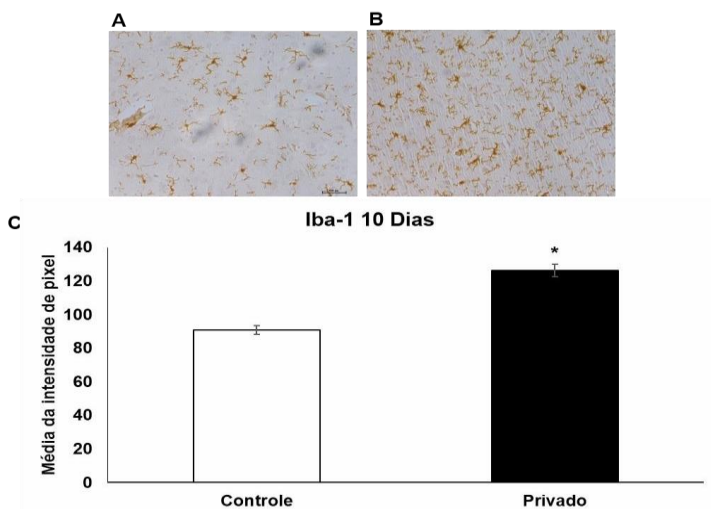


Figura 9 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 10. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

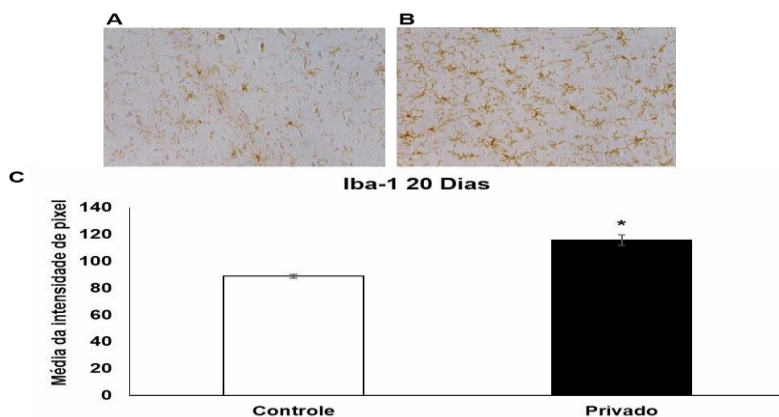


Figura 10 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 20. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

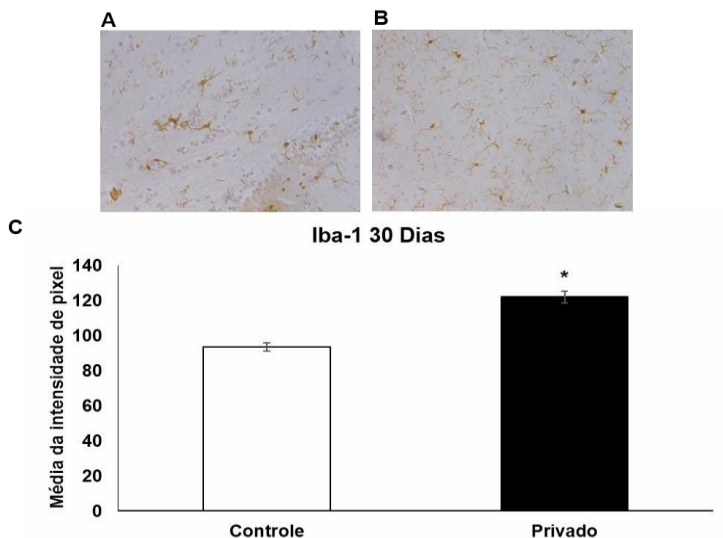


Figura 11 - Efeitos da privação materna em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 30. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

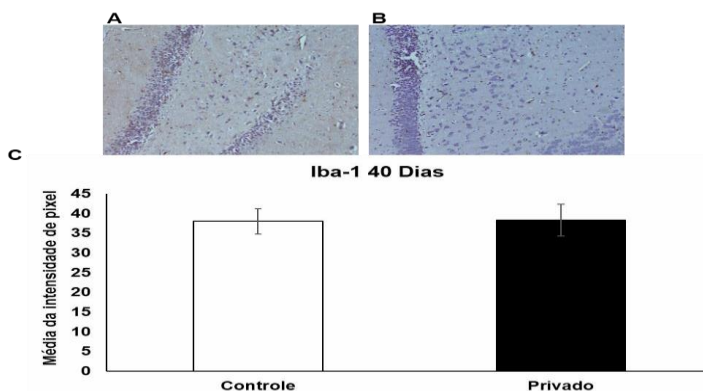


Figura 12 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 40. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

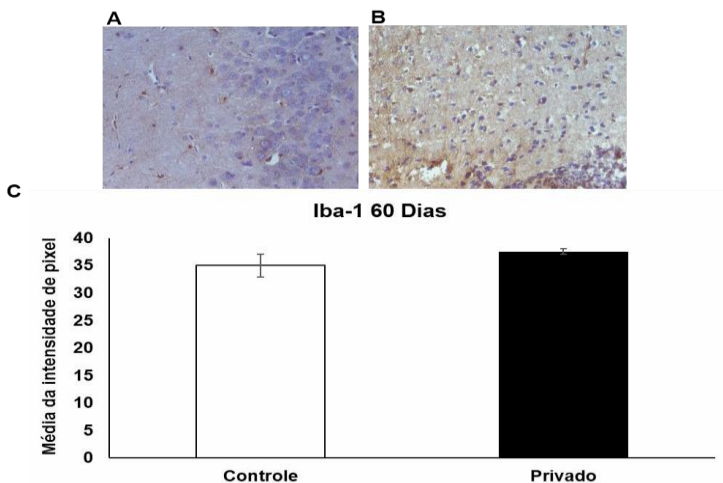


Figura 13 - Efeitos da PM em células imunopositivas para Iba-1 no hipocampo no DPN 60. Imagens representativas dos grupos controle (A) e privado (B) e média \pm erro padrão da média (C). * $p < 0,05$ diferente dos controles, de acordo com o Teste t *Student*.

3.10 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA EM IDO, GFAP E AIF-1 EXPRESSÃO NO CF E HIPOCAMPO

Os efeitos da privação materna na expressão do IDO são mostrados na figura 14. No DPN 10, a expressão do IDO não alterou no CF ($t = 1,725$; $df = 6$; $p = 0,135$; Fig. 14A). No entanto, na expressão da IDO do hipocampo foi reduzida no DPN 10 ($t = 2,488$; $df = 6$; $p = 0,047$; Fig. 14A). Em 20 DPN a expressão de IDO não foi alterada no CF ($t = 0,792$; $df = 4$; $p = 0,473$; Fig. 14B) ou hipocampo ($t = -0,917$; $df = 6$; $p = 0,394$; Fig. 14A). Da mesma forma, nos 30 e 40 DPN, a expressão de IDO não alterou (30 DPN; CF $t = -1,957$; $df = 7$; $p = 0,091$; hipocampo $t = -0,368$; $df = 7$; $p = 0,724$; Fig. 14C) e (40 DPN; CF $t = -0,544$; $df = 9$; $p = 0,599$; hipocampo $t = -0,773$; $df = 8$; $p = 0,462$; Fig. 14D). A expressão da IDO foi elevada no CF a 60 DPN ($t = -3,34$; $df = 8$; $p = 0,010$; Fig. 14E), mas na expressão de IDO no hipocampo não alterou a 60 DPN ($t = -0,94$; $df = 9$; $p = 0,927$; Fig. 14E).

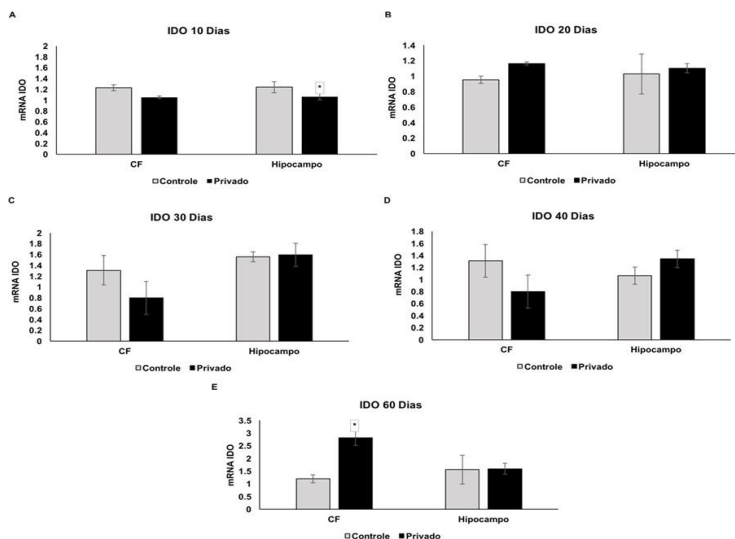


Figura 14 - Efeitos da privação materna na expressão gênica de IDO do hipocampo e CF em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$, diferente de não privados, de acordo com o teste *t* de *Student*.

A expressão de GFAP foi diminuída em 10 DPN no CF ($t = 2,845$; $df = 5$; $p = 0,036$; Fig. 15A), mas não alterou no hipocampo ($t = 0,460$; $df = 8$; $p = 0,658$; Fig. 5A). Nem no CF ou no hipocampo foram encontradas alterações na expressão de GFAP em 20, 30, 40 DPN após a PM (20 DPN, CF $t = -0,773$; $df = 4$; $p = 0,483$; hipocampo $t = -0,453$; $df = 6$; $p = 0,679$; Fig. 15B), (30 DPN; CF $t = 1,723$; $df = 6$; $p = 0,136$; hipocampo $t = -0,772$; $df = 7$; $p = 0,465$; Fig. 15C) e (40 DPN; CF $t = 1,323$; $df = 9$; $p = 0,219$; hipocampo $t = 0,334$; $df = 9$; $p = 0,094$; Fig. 15D). Na expressão de GFAP em 60 DPN não houve alteração no CF ($t = -1,647$; $df = 8$; $p = 0,138$; Fig. 15E). No entanto, no hipocampo, a expressão de GFAP foi aumentada a 60 DPN ($t = -4,599$; $df = 6$; $p = 0,004$; Fig. 15E).

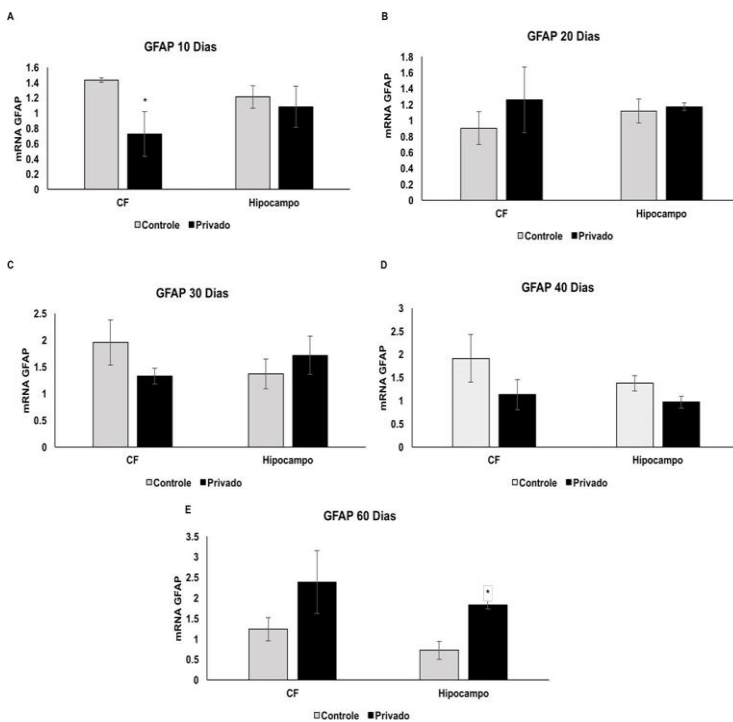


Figura 15: Efeitos da privação materna na expressão gênica de GFAP no CF e no hipocampo em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 (E) DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$, diferente de não-privado, de acordo com o teste t de *Student*.

A expressão de AIF-1, um marcador de ativação microglial, está ilustrada na figura 16. Em 10 DPN foi mostrado que a expressão de AIF-1 não alterou no CF de ratos privados ($t = 0,952$; $df = 2,147$; $p = 0,435$; Fig. 16A) e no hipocampo ($t = -2,433$; $df = 3,055$; $p = 0,092$; Fig. 16A). A 20 DPN, a expressão de AIF-1 foi aumentada no CF ($t = -4,667$; $df = 4$; $p = 0,010$; Fig. 6B), mas no hipocampo a 20 DPN a expressão de AIF-1 não foi alterada ($t = 1,856$; $df = 4,74$; $p = 0,134$; Fig. 16B). A expressão de AIF-1 não mudou em 30 e 40 DPN (30 DPN, CF $t = 1,009$; $df = 6$; $p = 0,352$; hipocampo $t = -1,079$; $df = 7$; $p = 0,316$; Fig. 16C) e (40 DPN; CF $t = 1,216$; $df = 9$; $p = 0,255$; hipocampo $t = 1,100$; $df = 7$; $p = 0,316$; Fig. 16D). A 60 DPN a expressão de AIF-1 foi aumentada no CF ($t = -5,089$; $df = 7$; $p = 0,001$; Fig. 16E), mas a expressão de AIF-1 não foi alterada a 60 DPN no hipocampo ($t = -0,137$; $df = 3,759$; $p = 0,898$; Fig. 16E).

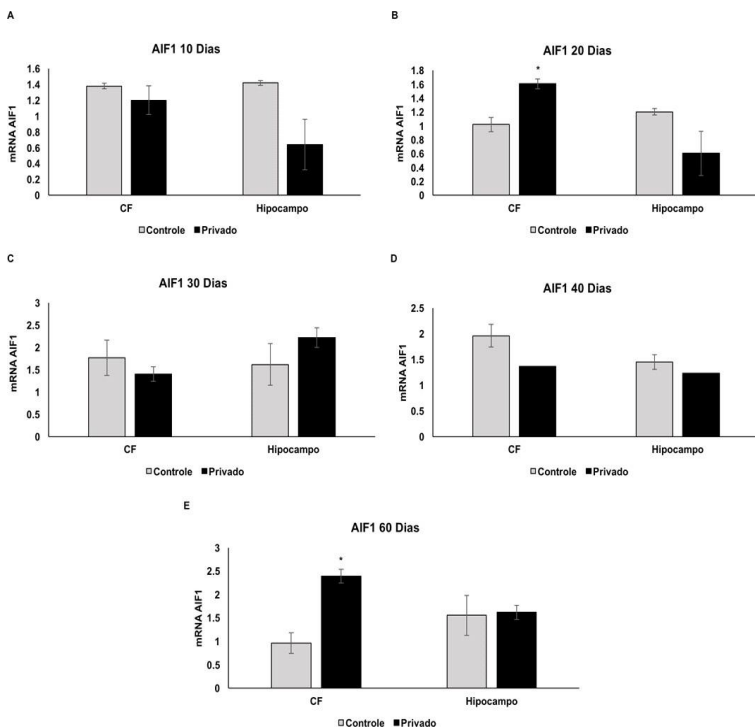


Figura 16 - Efeitos da privação materna na expressão gênica de AIF-1 no CF e no hipocampo em 10 (A), 20 (B), 30 (C) 40 (D) e 60 (E) DPN. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). * $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$, diferente de não privados, de acordo com o teste t de *Student*.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos transtornos do humor, incluindo TDM, parece estar associado à experiências adversas no início da vida (Widom et al., 2007). Nesse estudo, foi demonstrado que a privação materna induz comportamento do tipo depressivo na idade adulta (60 DPN) em ratos submetidos a PM. No entanto, alterações em células gliais, astrócitos e micróglia, bem como alterações na expressão da enzima IDO foram observadas em diferentes fases do desenvolvimento. Os resultados do presente estudo estão de acordo com estudos anteriores que também demonstraram que a PM foi capaz de induzir comportamento de tipo depressivo em ratos adultos, como demonstrado pelo comportamento anedônico no *splash* teste e aumento do tempo de imobilidade no TNF (Réus et al., 2011; 2015a; 2017; Ignácio et al., 2017;).

Recentemente, foi demonstrado que ratos submetidos a PM apresentaram comportamento depressivo no TNF em 60 DPN, no entanto, um aumento na neuroinflamação e no estresse oxidativo foi evidente em outros períodos do desenvolvimento (Réus et al., 2017), sugerindo que a PM leva a alterações inflamatórias que podem influenciar as respostas comportamentais tardias.

Estudos têm sugerido que um estado inflamatório pode afetar células residentes no cérebro, como neurônios, astrócitos e micróglia. De fato, os camundongos nocautes para IL- 18 (-/-) apresentam ativação microglial induzida pelo estresse (Sugama et al., 2007), propondo um papel importante das citocinas na regulação microglial em resposta ao estresse. Além disso, os camundongos submetidos ao estresse no período pré-natal aumentaram os níveis de RNAm de IL-1 e o número total de ativação microglial, marcado por Iba-1 no hipocampo (Diz-Chavez et al., 2012). Outro estudo revelou que a ativação imune materna induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos leva a um aumento na expressão das citocinas pró- inflamatórias durante o desenvolvimento do cérebro fetal e é mantido por toda a vida. Além disso, a inflamação induzida pela ativação imune materna desencadeou uma ativação microglial e alterou os astrócitos na amígdala no período pré-natal (O'Loughlin et al., 2017).

Os astrócitos são células gliais importantes envolvidas na manutenção da homeostase metabólica, iônica e neurotransmissores no cérebro. Além disso, estudos relataram que os astrócitos desempenham um papel fundamental nas condições psiquiátricas, incluindo o TDM (Monai e Hirase, 2017; Kim et al., 2017, Sild et al., 2017). O GFAP é uma proteína citoesquelética expressa por astrócitos e exibe uma função

importante na estrutura e movimento celular, além de desempenhar um papel na comunicação neurônio-astrocitos (Nedergaard et al., 2003). Um aumento na expressão de GFAP está associado à ativação de astrócitos (Middeldorp e Hol, 2011). Embora existam estudos documentando o papel dos astrócitos no TDM, pouca atenção tem sido dada aos efeitos da PM em diferentes estágios de desenvolvimento.

Nesse estudo, foi demonstrado que ratos submetidos à PM tiveram redução em células imonopositivas para GFAP no hipocampo em 20 DPN e no CF em 10 DPN. No entanto, o GFAP foi aumentado em 40 e 60 DPN no hipocampo após a PM, sugerindo que células astrocíticas têm diferentes tipos de ativação durante o desenvolvimento. De fato, os astrócitos desempenham um papel importante na função sináptica, na formação e na remodelação durante o desenvolvimento (Parikshak et al., 2013). Além disso, as funções de astrócitos podem alterar durante o desenvolvimento devido a lesões ou mudanças nas condições fisiológicas (Procko et al., 2011).

Estudos clínicos revelam que tanto o RNAm como o número de células imunopositivas GFAP são diminuídos no córtex cerebral e no hipocampo de pacientes com TDM (Si et al., 2004; Webster et al., 2005). Estudos experimentais também têm relatado uma diminuição na expressão e células imunopositivas de GFAP no córtex cerebral e hipocampo de roedores submetidos a estresse crônico (Czéh et al., 2006; Banasr et al., 2010). De acordo com o presente estudo onde se encontrou uma redução do GFAP no início da vida (10 e 20 DPN), outro estudo relatou que ratos da linhagem Fischer com 14 dias submetidos à PM tiveram uma redução na densidade de astrócitos reativos para GFAP no cérebro, em áreas implicadas no comportamento associado ao estresse (Leventopoulos et al., 2007). No entanto, ratos machos e não fêmeas, submetidos à PM tiveram um aumento nas células imunopositivas do GFAP no hipocampo e no córtex (LLorente et al., 2009). Esses achados indicam que a PM pode induzir respostas diferentes nos astrócitos durante o desenvolvimento e essas respostas podem ser relacionadas ao sexo. De fato, é frequente uma menor quantidade de GFAP no CF de indivíduos jovens com TDM, indicando que alterações astrocitárias poderiam ser um contribuidor inicial para a fisiopatologia da TDM (Miguel-Hidalgo et al., 2000; Sanacora e Banasr, 2013).

Os dados do presente estudo revelaram que ratos submetidos à PM tiveram um aumento no GFAP RNAm e GFAP células imunopositivas na vida adulta, indicando um aumento na ativação de astrócitos. Estes resultados podem estar ligados a uma diminuição da

ativação microglial marcada por Iba-1 neste período de

desenvolvimento. De fato, um estudo com cultura de células neuronais e gliais danificadas por uma neurotoxina dopaminérgica, foi

demonstrado uma ativação de astrócitos seguidos de uma ativação microglial (Zhang et al., 2010).

Os resultados apresentados mostraram uma ativação microglial marcada por Iba-1 em 10, 20 e 30 DPN, e AIF-1 em 20 e 60 DPN. Iba-1 é expresso em macrófagos de meninges cerebrais, macrófagos supraependimais, células superficiais e estromais do plexo coróideo, bem como na micróglia (Kirik et al., 2010). A expressão de Iba-1 é aumentada em condições patológicas (Ito et al., 1998; 2001; Biesmans et al., 2013). Além disso, o estresse crônico é capaz de aumentar células positivas Iba-1 no CF de camundongos susceptíveis à anedonia (Couch et al., 2013). Alguns estudos sugerem que o AIF-1 é considerado idêntico ao Iba-1. No entanto, nem todos os anticorpos de uso comum contra Iba-1/AIF-1 demonstram o mesmo resultado (Kirik et al., 2010). AIF-1 é uma proteína citoplasmática de 143 aminoácidos identificada principalmente em humanos e ratos. Evidências sugerem que o AIF-1 está envolvido em processos inflamatórios (Autieri et al., 2002). De fato, o AIF-1 é expresso por células T ativadas e macrófagos, e regula a expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas (Zhao et al., 2013).

Estudos demonstram que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pela micróglia podem induzir hipertrofia de astrócitos (Zhang et al., 2010). Os níveis de citocinas produzidas por micróglia são elevados em resposta ao dano, e alguns receptores de citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- α também são encontrados em astrócitos (Norris et al., 1994; Nakamura et al., 2005; Benveniste e Benos, 1995). As células microgliais residem no SNC e, em resposta a alterações fisiológicas, podem ser ativadas por alterações na sua morfologia e funções. Estudos relataram que a ativação microglial está implicada na fisiopatologia do TDM (Réus et al., 2015b, Sild et al., 2017).

Vários estressores crônicos são capazes de induzir a proliferação microglial no cérebro de roedores e esses efeitos estão associados ao comportamento depressivo (Nair e Bonneau, 2006). O presente estudo revela que as mudanças comportamentais ocorreram na vida adulta, diferentemente da alteração astrocitária e da ativação microglial que foram mais evidentes no início da vida após a privação materna. Estes resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, por alterações nas células neuronais induzidas inicialmente por alterações gliais. Realmente, os níveis elevados de glutamato por longos períodos, devido a atrofia de astrócitos ou mediadores inflamatórios vindos da micróglia, poderiam ser fatores contribuintes para a perda sináptica e dendrítica (Kang et al., 2012;

Hercher et al., 2010), levando a uma deficiência na função neuronal.

De fato, as células microgliais desempenham um papel importante na neurogênese, na sinaptogênese e na remodelação de axônios e sinapses. Esse estudo parece ser o primeiro a demonstrar os efeitos da PM na ativação microglial marcada por Iba-1 e AIF-1 durante o desenvolvimento. Zhao e colaboradores (2014) revelaram que a privação do sono materno nos dias de gestação 4, 9 e 18 induziu comprometimento cognitivo, comportamento anedônico e aumentou mediadores inflamatórios e ativação microglial no hipocampo da prole em 20 DPN. Além disso, os marcadores microgliais para o fenótipo M1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , CD68 e óxido nítrico sintetase foram aumentados, enquanto que o tratamento com minociclina, um fármaco com propriedades inflamatórias, reduziu as células imunopositivas Iba-1 e a produção de citocinas na prole (Zhao et al., 2015). Esses achados indicam que os estressores durante os dias pré e pós-natais podem induzir alterações microgliais que persistem durante o desenvolvimento.

A Figura 17 busca demonstrar a relação entre a ativação microglial, com liberação de citocinas, posterior ativação astrocitária e envolvimento na regulação de neurotransmissores (serotonina e glutamato) na fenda sináptica.

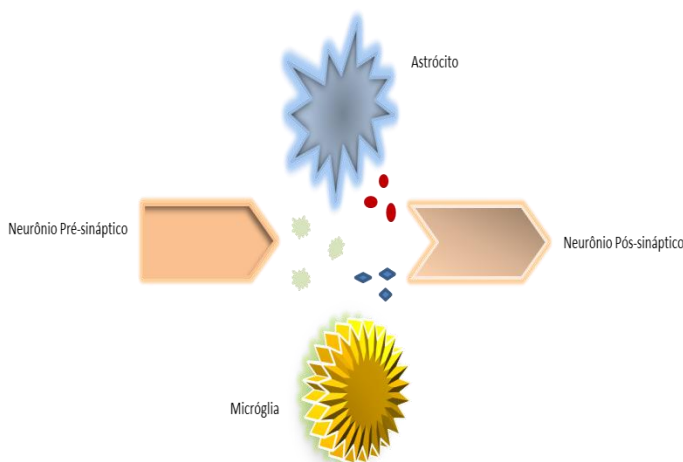


Figura 17 - Relação entre a ativação microglial, com liberação de citocinas (azul), ativação astrocitária, neurônio pré e pós-sináptico. Possivelmente ocasionando uma alteração na disponibilidade de neurotransmissores: serotonina (cinza) e glutamato (vermelho).

As citocinas inflamatórias a partir da ativação microglial podem ativar a IDO, uma enzima responsável por metabolizar o TRP na via da quinurenina (Leklem, 1971; Réus et al., 2015c, Cervenka et al., 2017). Em células microgliais, a quinurenina é preferencialmente convertida em ácido quinolênico, um metabólico neurotóxico, ou quinurênico, que possui efeitos neuroprotetores mediados por receptores NMDA (McNally et al., 2008; Muller e Schwarz, 2007), assim, a via quinurenina pode desempenhar um duplo papel, dependendo do equilíbrio da via e dos fatores que a influenciam.

A via da quinurenina tem sido implicada na fisiopatologia de condições psiquiátricas, incluindo a esquizofrenia (Réus et al., 2018) e o TDM (Réus et al., 2015c). No presente estudo, foi revelado que a expressão da IDO diminuiu no hipocampo em 10 DPN (infância) e aumentou no CF a 60 DPN (adulto). A expressão de enzimas e componentes-chave da via da quinurenina reflete que essa via está presente durante o desenvolvimento embrionário (Beal et al., 1992; Saito et al., 1993). Além disso, a via da quinurenina é considerada importante no desenvolvimento cerebral. De fato, mudanças na transmissão sináptica e na expressão da proteína envolvida com a neuroplasticidade, foi

demonstrada no cérebro de ratos Wistar adultos após a inibição pré-natal da via da quinurenina (Forrest et al., 2013).

Assim, sugere-se que uma menor expressão de IDO em 10 DPN encontrada em ratos privados no presente estudo poderia estar associada ao fenótipo comportamental tardio. Outra hipótese é que as mudanças na via da quinurenina mediada por IDO podem ser atribuídas a um estado inflamatório, principalmente por ativação microglial induzida por PM e então, indução da atividade IDO e síntese de metabolitos neurotóxicos (Chaves-Filho et al., 2018). De fato, o início da gravidade dos sintomas depressivos em pacientes sob imunoterapia está fortemente associado à atividade IDO (Vignau et al., 2009). Muitas citocinas pró-inflamatórias podem ser indutoras da expressão de IDO incluindo TNF- α e IL-1 β (Oxenkrug, 2010; Feltes et al., 2017). Em ratos adultos (60 DPN) submetidos a PM, maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias foram relatados na periferia e nas áreas do cérebro envolvidas com TDM (Réus et al., 2015d, 2017).

No entanto, a cetamina, um antagonista do receptor NMDA, foi capaz de diminuir os níveis de citocinas inflamatórias e exibir efeitos antidepressivos em ratos adultos após a PM (Réus et al., 2015d), os resultados sugerem que o aumento da expressão de IDO em ratos adultos privados poderia estar associado, pelo menos em parte, aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias estimulados pela ativação microglial em estágios iniciais da vida.

O comportamento depressivo induzido por LPS em camundongos com obesidade genética foi associado à ativação de IDO após níveis elevados de TNF- α e IL-1 β no hipocampo (Dinel et al., 2014). Por outro lado, a diminuição da expressão de IDO a 10 DPN encontrada no presente estudo pode ser atribuída aos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10. De fato, essas citocinas podem inibir a IDO (Oxenkrug, 2010). Resultados do laboratório (dados não publicados) revelaram um aumento na IL-10 no cérebro de ratos a 10 DPN após a PM, assim a redução na expressão de IDO poderia estar associada a níveis elevados de IL-10.

Ao contrário, a IL-10 foi reduzida ao longo do desenvolvimento (DPN 20, 30, 40 e 60) (Réus et al., 2017), de acordo com a expressão elevada de IDO conforme relatado na vida adulta. A relação da ativação de IDO pelas citocinas pró-inflamatórias com desvio do TRP para via das quinurinas e consequente diminuição da disponibilidade serotoninérgica, bem como produção de QUIN (agonista do receptor NMDA) está representada na Figura 18.

Uma limitação do presente estudo é o fato de que os metabólitos

da via da quinurenina não foram avaliados para explorar se alterações encontradas são manifestações devido à ativação de metabólitos neurotóxicos da via ou outro mecanismo não considerado.

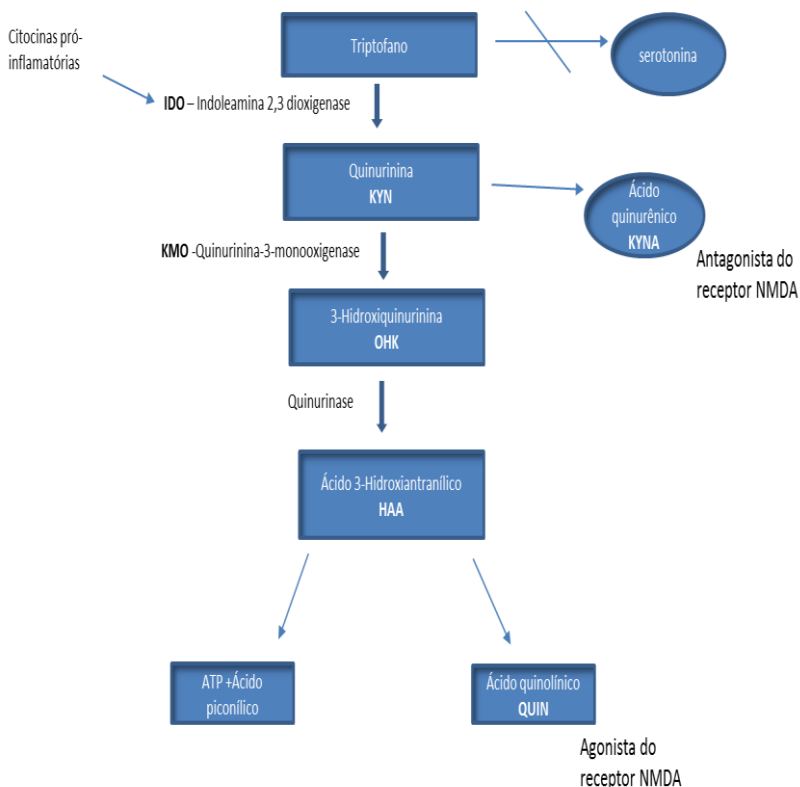


Figura 18 - Representação da ativação de IDO, com desvio do triptofano para via das quinurinas, diminuição serotoninérgica e ativação do receptor NMDA.

Ativação da IDO por citocinas pró-inflamatórias (IL-10), liberadas por micróglias ativadas. Desviando o triptofano para a via da quinurina, diminuindo a disponibilidade de serotonina. Produzindo quinurina (KYN), que pode ser metabolizada em Ácido quinurênico (KYNA), um antagonista do receptor NMDA. Ou seguir na via das quinurinas sendo metabolizado pela quinurina 3-monooxigenase (KMO) em 3-hidroxiquinurina (OHK), que pela ação da quinurina torna-se Ácido 3-hidroxi-antranílico (HAA), tendo por metabólito final ATP + Ácido piconílico e Ácido quinolínico (QUIN), agonista do receptor NMDA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os achados desse estudo sugerem que o estresse induzido pela PM no início da vida desempenha um papel negativo no comportamento ao longo da vida, além de alterar células cerebrais e vias envolvidas com a neuroplasticidade e a sobrevivência neuronal. Embora as alterações comportamentais tenham ocorrido apenas na vida adulta, as alterações nos marcadores associados à ativação microglial e astrocitária, e alterações na enzima IDO foram detectadas no início da vida. Essas mudanças podem ser, pelo menos em parte, envolvidas no fenótipo comportamental de longo prazo. Mais estudos são necessários para investigar melhor a via da quinurenina e como ela está conectada ao dano de células gliais e neuronais durante o desenvolvimento após o trauma induzido pela PM. Além disso, uma abordagem terapêutica direcionada a essas células e vias poderia ser melhor investigada.

REFERÊNCIAS

- Afifi TO, Enns MW, Cox BJ, Asmundson GJG, Stein MB, Sareen J. Population attributable fractions of psychiatric disorders and suicide ideation and attempts associated with adverse childhood experiences. *Am J Public Health*. 2008; 98: 946–952.
- Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: A meta- analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord*. 2000; 58: 19–36.
- Aronica E, Gorter J A, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 2106–2118.
- Autieri MV, Kelemen S, Thomas BA, Feller ED, Goldman BI, Eisen HJ. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 2002; 106: 2218-2223.
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry*. 2010; 15: 501-511.
- Barger SW, Basile AS. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cysteine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem*. 2001; 76: 846–854.
- Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, Beggs ML. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J Neurochem*. 2007; 101: 1205– 1213.
- Beal MF, Swartz KJ, Isacson O. Developmental changes in brain kynurenic acid concentrations. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992; 68: 136-139.
- Benveniste EN, Benos DJ. TNF-alpha- and IFN-gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J*. 1995; 9: 1577-1584.
- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 137–151.
- Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 271359.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia

- and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013; 39: 3–18.
- Brown GW, Harris T, Copeland JR. Depression and loss. *Br J Psychiatry.* 1977; 130: 1-18.
- Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science.* 2017; 357: eaaf9794.
- Chaves Filho AJM, Lima CNC, Vasconcelos SMM, de Lucena DF, Maes M, Macedo D. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018; 80: 234-249.
- Couch Y, Anthony DC, Dolgov O, Revischin A, Festoff B, Santos AI, Steinbusch HW, Strekalova T. Microglial activation, increased TNF and SERT expression in the prefrontal cortex define stress-altered behaviour in mice susceptible to anhedonia. *Brain Behav Immun.* 2013; 29: 136-146.
- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31:1616-1626.
- Davidson RJ, McEwen BS. Social influences on neuroplasticity: stress and interventions to promote well-being. *Nat Neurosci.* 2012; 15: 689-695.
- Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry.* 2006; 61: 7- 11.
- Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 40: 48- 59.
- Ekdahl CT. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 41-10.
- Elovainio M, Hurme M, Jokela M, Pulkki-Råback L, Kivimäki M, Hintsanen M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms: results from the Young Finns Study. *Psychosom Med.* 2012; 74: 675-681.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007; 28: 138-145.
- Forrest CM, Khalil OS, Pizar M, McNair K, Kornisiuk E, Snitcowsky M,

- Gonzalez N, Jerusalinsky D, Darlington LG, Stone TW. Changes in synaptic transmission and protein expression in the brains of adult offspring after prenatal inhibition of the kynurenine pathway. *Neuroscience*. 2013; 254: 241-259.
- Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Rodríguez-Quiroga A, Arango C. Oxidative Stress and Inflammation in Early Onset First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta- Analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017; 20: 435-444.
- Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol*. 2008; 29: 357–365.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388: 1545-1602.
- Gomes FCA, Tortelli VP, Diniz L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estud Av*. 2013; 27: 61-84.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem*. 2001; 78: 842-853.
- Gulyaeva NV. Interplay between Brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. *Biochemistry*. 2017; 82: 301-307.
- Hercher C, Canetti L, Turecki G, Mechawar N. Anterior cingulate pyramidal neurons display altered dendritic branching in depressed suicides. *J Psychiatr Res*. 2010; 44: 286-293.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization – new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11: 56–64.
- Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, de Moura AB, Matos D, Demo JP, da Silva JB, Gava FF, Valvassori SS, Carvalho AF, Quevedo J. Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. *Behav Brain Res*. 2017b; 320: 225-232.
- Ignácio ZM, Réus GZ, Quevedo J, Kalinichev M, Francis D. Maternal Deprivation. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier, 2017a. ISBN 9780128093245.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.

Brain Res Mol Brain Res. 1998; 57: 1– 9.

Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*. 2001; 32: 1208–1215.

Jespersen L, Abildstrøm SZ, Hvelplund A, Prescott E. Persistent angina: highly prevalent and associated with long-term anxiety, depression, low physical functioning, and quality of life in stable angina pectoris. *Clin Res Cardiol*. 2013; 102: 571-581.

Juli A, Juli L. Cytokine levels in depressed and non-depressed subjects, and masking effects of obesity. *Psychiatr Danub*. 2014; 1: 115-116.

Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznernski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M, Son H, Duman RS. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med*. 2012; 18: 1413-1417. Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. A glycine site associated with N-methyl-D- aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem*. 1989; 52: 1319-1328.

Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 44.

Kim R, Healey KL, Sepulveda-Orengo MT, Reissner KJ. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; S0278-5846:30485-2.

Kirik OV, Sukhorukova EG, Korzhevskii DE. Calcium-binding Iba-1/AIF-1 protein in rat brain cells. *Morfologiya*. 2010; 137: 5-8.

Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP. Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience*. 2010; 169: 1848-1859.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008; 455: 894– 902.

Kunugi H, Sugawara N, Aoki H, Nanko S, Hirose T, Kazamatsuri H. Early parental loss and depressive disorder in Japan. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1995; 245: 109-113.

Leklem JE. Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *Am J Clin Nutr*. 1971; 24: 659-672.

Leventopoulos M, Rüedi-Bettschen D, Knuesel I, Feldon J, Pryce CR, Opacka-Juffry J. Long- term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain Res*. 2007; 1142: 119- 126.

- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27: 233-241.
- Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 48: 102-111.
- Machado-Vieira R, Salvatore G, DiazGranados N, Ibrahim L, Latov D, Wheeler Castillo C, Baumann J, Henter ID, Zarate CA Jr. New Therapeutic Targets for Mood Disorders. *ScientificWorldJournal*. 2010; 10: 713-726.
- Maes M, Stevens W, DeClerck L, Bridts C, Peeters D, Schotte C, Cosyns P. Immune disorders in depression: higher T helper/T suppressor- cytotoxic cell ratio. *Acta Psychiatr Scand*. 1992; 86: 423-431.
- Maes M. Cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 1994; 36: 498-499.
- Maiorino C, Khorrooshi R, Ruffini F, Løbner M, Bergami A, Garzetti L, Martino G, Owens T, Furlan R. Lentiviral-mediated administration of IL-25 in the CNS induces alternative activation of microglia. *Gene Ther*. 2013; 20: 487-496.
- Marshall AS, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: the importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis*. 2013; 54: 239-251.
- McNally L, Bhagwagar Z, Hannestad J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr*. 2008; 13: 501-510.
- Mello PB. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92: 364-369.
- Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology*. 2017; 42: 62-80.
- Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011; 93: 421-443.
- Miguel-Hidalgo JJ, Baucom C, Dilley G, Overholser JC, Meltzer HY, Stockmeier CA, Rajkowska G. Glial fibrillary acid protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2000; 48: 861-873.

- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 65: 732–741.
- Miller AJ, Zégre Z. Landscape-Scale Disturbance: Insights into the Complexity of Catchment Hydrology in the Mountaintop Removal Mining Region of the Eastern United States. *Land*. 2016; 5: 22.
- Miller AM. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatr Clin North Am*. 1998; 21: 443–463.
- Monai H, Hirase H. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. *Neurosci Res*. 2017; S0168-0102: 30532-1.
- Morris G, Berk M, Klein H, Walder K, Galecki P, Maes M. Nitrosative Stress, Hypernitrosylation, and Autoimmune Responses to Nitrosylated Proteins: New Pathways in Neuroprogressive Disorders Including Depression and Chronic Fatigue Syndrome. *Mol Neurobiol*. 2017; 54: 4271–4291.
- Muller N, Hofschuster E, Ackenheil M, Mempel W, Eckstein R. Investigations of the cellular immunity during depression and the free interval: evidence for an immune activation in affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1993; 17: 713–730.
- Muller N, Schwarz MJ. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry*. 2007; 12: 988–1000.
- Muller N. Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation*. 2014; 21: 123–130.
- Nair A, Bonneau RH. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol*. 2006; 171: 72–85.
- Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of Neuroinflammation*. 2013; 10: 43.
- Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005; 28: 197–204.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003; 26: 523–530.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002; 34: 13–25.
- Nishida A, Hisaoka K, Zensho H, Uchitomi Y, Morinobu S, Yamawaki S. Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *Int*

immunopharmacol. 2002; 2: 1619-26.

Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1994; 152: 841-850.

Oxenkrug GF. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1199: 1-14.

Parasram K. Phytochemical treatments target kynurenine pathway induced oxidative stress. *Redox Rep.* 2017; 26: 1-4.

Parikshak NN, Luo R, Zhang A, Won H, Lowe JK, Chandran V, Horvath S, Geschwind DH. Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell.* 2013; 155: 1008-1021.

Pawlik A, Kotrych D, Paczkowska E, Roginska D, Dziedziejko V, Safranow K, Machalinski Expression of allograft inflammatory factor-1 in peripheral blood monocytes and synovial membranes in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 2016; 77: 131-136.

Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol.* 1992; 22: 2429-2436.

Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine.* 1979; 30: 139-140.

Procko C, Lu Y, Shaham S. Glia delimit shape changes of sensory neuron receptive endings in *C. elegans*. *Development.* 2011; 138: 1371-1381.

Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G, et al. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- alpha: relationship to CNS immune responses and depression. *Mol Psychiatry.* 2009; 15: 393- 403.

Reshef R, Kreisel T, Beroukhim Kay D, Yirmiya R. Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal but not olfactory bulb related memory and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2014; 41: 239-250.

Réus GZ, Abelaira HM, Santos MAB, Carlessi AS, Tomaz DB, Neottia MV, Liranc, o JLG, Gubertb C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res.* 2013b; 256: 451-456.

Réus GZ, Becker IRT, Scaini G, Petronilho F, Oses JP, Kaddurah-Daouk R, Ceretta LB, Zugno AI, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Barichello T.

The inhibition of the kynurenine pathway prevents behavioral disturbances and oxidative stress in the brain of adult rats subjected to an animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 81: 55- 63.

Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol*. 2015c; 75: 1268-1281.

Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, de Souza TG, Abelaira HM, Carneiro C, Wendhausen D, Michels M, Pescador B, Dal-Pizzol F, Macêdo DS, Quevedo J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res*. 2017a; 95: 196-207.

Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neurosci Lett*. 2015a; 584: 83-87.

Réus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res*. 2015b; 68: 316-328.

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, Dos Santos MA, Carlessi AS, Da Luz JR, Gonçalves RC, Vuolo F, Dal-Pizzol F, Carvalho AF, Quevedo J. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett*. 2014; 584: 83-87.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res*. 2011; 36: 460-466

Rial D, Lemos C, Pinheiro H, Duarte JM, Gonçalves FQ, Real JJ, Prediger RD, Gonçalves N, Gomes CA, Canas PM, Agostinho P, Cunha RA. Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2016; 9: 521.

Rothermundt M, Arolt V, Peters M, Gutbrodt H, Fenker J, Kersting A, Kirchner H. Inflammatory markers in major depression and melancholia. *J Affect Disord*. 2001; 63: 93- 102.

Saito K, Nowak TS Jr, Suyama K, Quearry BJ, Saito M, Crowley JS, Markey SP, Heyes MP. Kynurenine pathway enzymes in brain:

responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation. *J Neurochem.* 1993; 61: 2061-2070.

Sanacora G, Banasr M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2013; 73: 1172-1179.

Santello M, Volterra A. TNF α in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 638–647.

Schildkraut J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry.* 1965; 122: 509-522.

Si X, Miguel-Hidalgo JJ, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Rajkowska G. Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29: 2088-2096.

Sild M, Ruthazer ES, Booij L. Major depressive disorder and anxiety disorders from the glial perspective: Etiological mechanisms, intervention and monitoring. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017; 83: 474-488.

Šišková Z, Tremblay MÈ. Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. *Neural Plast.* 2013; 2013: 425845.

Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry.* 2013; 26: 19–26.

Szelényi J, Vizi ES. The catecholamine-cytokine balance: interaction between the brain and the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1113: 311-324.

Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, Sato K. L-glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the ‘collusion’ hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 275.

Trivedi MH, Hollander E, Nutt D, Blier P. Clinical evidence and potential neurobiological underpinnings of unresolved symptoms of depression. *J Clin Psychiatry.* 2008; 69: 246-258.

Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, Walker Fr. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 75–91.

Vignau J, Costisella O, Canva V, Imbenotte M, Duhamel A, Lhermitte M. Impact of interferon alpha immunotherapy on tryptophan metabolism in patients with chronic hepatitis

Results of a pilot studies on ten patients. *L'Encéphale*. 2009; 35: 477-483.

Webster MJ, O'Grady J, Kleinman JE, Weickert CS. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience*. 2005; 133: 453-461.

Widom CS, DuMont K, Czaja SJ. A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64: 49-56.

Winnicott DW. On influencing and being influenced. *New Era in Home and School*, 1941, 22. In: 1957b (35-39), 1964a (199-204).

World Health Organization. Sixty-fifth World Health Assembly. 2012.

Zavaschi MLS, Satler F, Poester D, Vargas CF, Piazenski R, Rohde LAP et al . Associação entre trauma por perda na infância e depressão na vida adulta. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2002; 24: 189-195.

Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol*. 2010; 41: 232-241.

Zhao Q, Peng C, Wu X, Chen Y, Wang C, You Z. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. *Neurobiol Dis*. 2014; 68: 57-65.

Zhao Q, Xie X, Fan Y, Zhang J, Jiang W, Wu X, Yan S, Chen Y, Peng C, You Z. Phenotypic dysregulation of microglial activation in young offspring rats with maternal sleep deprivation- induced cognitive impairment. *Sci Rep*. 2015; 5: 9513.

Zhao YY, Yan DJ, Chen ZW. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell Immunol*. 2013; 284: 75-83.

Zhu Z, Wang G, Ma K, Cui S, Wang J.H. GABAergic neurons in nucleus accumbens are correlated to resilience and vulnerability to chronic stress for major depression. *Oncotarget*. 2017; 8: 35933-35945.

ANEXO

ANEXO I – CERTIFICADO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação das interações neuroimunes no transtorno depressivo maior durante o desenvolvimento", registrada com o protocolo nº 058/2016-1, sob a responsabilidade de Josiane Budni, junto à equipe: Gislaine Z. Réus, Helena M. Abelaira, Gabrielly Cruvinel Fernandes, Amanda Luiz Maciel, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 31/05/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2016 a 01/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	50-350g / 1 a 60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "The neuroimmune basis underlying the developmental programming of depressive-like behavior induced by experimental maternal care deprivation".


Protocol number: 058/2016-1

Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Gislaine Z. Réus, Helena M. Abelaira, Gabrielly Cruvinel Fernandes, Amanda Luiz Maciel, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 31 de maio de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA